

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-503622

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月20日

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/08		9161-4B	
C 07 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	C 12 N 15/00 Z N A A
			審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全17頁) 最終頁に続く

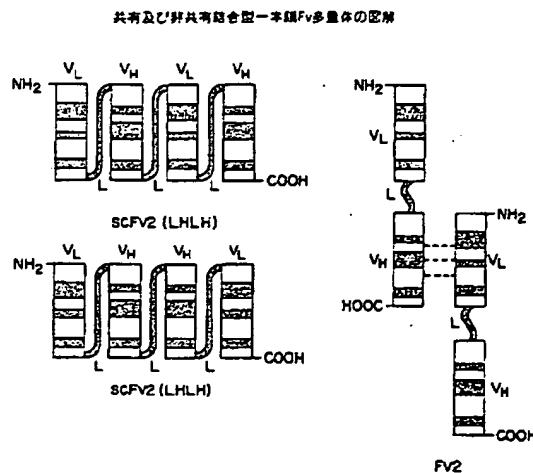
(21)出願番号 特願平6-514437
(86) (22)出願日 平成5年(1993)12月10日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日
(86)国際出願番号 PCT/US93/12039
(87)国際公開番号 WO94/13806
(87)国際公開日 平成6年(1994)6月23日
(31)優先権主張番号 990, 263
(32)優先日 1992年12月11日
(33)優先権主張国 米国(US)
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人 ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー
アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット・ロード, ダウ・センター 2030
(72)発明者 メゼス, ピーター・エス.
アメリカ合衆国, コネチカット 06371,
オールドライム, シル・レーン 25
(72)発明者 ゴーリー, ブライアン・ビー.
アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード・ドライブ 3713
(74)代理人 弁理士 石田 敬(外3名)

(54)【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57)【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。



特表平7-503622 (2)

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと
連結せしめる第二のペプチドリンカー；
を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

特許(内容に変更なし)

請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは：

- (a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Ile Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Lys

Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この重鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは：

- (a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

特許(内容に変更なし)

明細書

多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外來物であると判断する特定の抗原又は物質に応答して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV₁及びV₂と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は該

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビオ治療及び診断にとってのネズミ抗体の役とは、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換DNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1066-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 899-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体様分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが望まれる。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透通性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV₁と一本のV₂とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

特表平7-503622 (3)

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；
を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は 2 本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；
を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が 2 種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

図面の簡単な説明

図 1 は、 $V_L-L-V_n-L-V_L-L-V_n$ (LHLH) と $V_L-L-V_n-L-V_n-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型 Pv 一本鎖抗体 (Pv2) を示す。

図 2 は CC49V_n のヌクレオチド配列を示す。

図 3 は CC49V_n のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V_n のヌクレオチド配列を示す。

図 5 は CC49V_n のアミノ酸配列を示す。

図 6 は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 7 は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図 8 はプラスミド pSL301T 及び pSL301HT の構造を示す。

図 9 はプラスミド p49LHLH の構造を示す。

図 10 はプラスミド p49LHHL の構造を示す。

図 11 は CC49IgG, CC49scPv2 及び CC49scPv を用いた、融合因子としてビオチニル化 CC49IgG を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

複数、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらは IUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scPv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 V_L-L-V_n により表わされる、ペプチドリンカー (L) により V_n ドメインに連結された V_L ドメインを含むポリペプチドを意味する。 V_L と V_n ドメインとの順序は逆であってよく、 V_n-L-V_L として表わされるポリペプチドが獲得できる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_n-L-V_L-L-V_n$; $V_L-L-V_n-L-V_n-L-V_L$; $V_n-L-V_L-L-V_n-L-V_L$;
又は

$V_n-L-V_L-L-V_L-V_n$

の V_L と V_n ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチド調リンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 V_L と V_n ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_n-L-V_n-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_n-L-V_n$

で表示されうる多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_n-L-V_L-L-V_n$ (LHLH) 及び $V_L-L-V_n-L-V_n-L-V_L$ (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図 1 に示す。非共有結合型 Pv 一本鎖抗体 (Pv2) も図 1 に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の種類及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その種類と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA 配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA 配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって得てできる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された Kabat らの Sequences of Proteins of Immunological Interest 第 4 版 (1981) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNA の起

特表平7-503622 (4)

源として、逆転写酵素仲介合成により mRNA から獲得した cDNA 配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNA の起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログ ATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20308 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがその Collection より入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及び他の類似の種類が、可変ドメインをコードする mRNA の起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できうる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好適にはマウスを免疫することにより得られもする。その抗原は課題の抗原であるか、又はハブテンであるとき、キーホールリソベットヘモシアニン (KLE) の如きの抗原に対するこのハブテンの抗原性抱合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は 2 ~ 3 週間置きの免疫原の 1 回又は数回の繰り返し注射によって好適に実施されうる。通常、最後の負荷の 3 日後、脾臓を取り出し、そして mRNA が当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できうるようハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用な V_l 及び V_h ドメインは好ましくは、1990 年 3 月 3 日に公開された PCT 出願 WO 90/04410 及び 1986 年 1 月 26 日に公開された PCT 出願 WO 89/00692 に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質 72 抗原に対する一連の CC 抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT 公開 WO 90/04410 及び WO 89/00692 に

おいて CC49 と表示されているモノクローナル抗体に由来する V_l 及び V_h ドメインである。CC49 の V_l をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) は図 1 に示すものと実質的に同じである。CC49 の V_h のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) は図 2 に示すものと実質的に同じである。CC49 の V_l をコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 3) は図 3 に示すものと実質的に同じである。CC49 の V_h をコードするアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 4) は図 4 に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V_l と V_h ドメインを連結するための適当なリンカーは、V_l と V_h ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFv を連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントの V_l 及び V_h ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2 以上の scFv を連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,946,778 号に開示の方法により獲得できうる。この第 4,946,778 号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、V_l と V_h ドメインを連結して scFv を形成せしめるペプチドリンカーと、2 以上の scFv を連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、Pantoliano らの Biochem., 30, 10117-10125 (1991) に開示されている 205C と称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にある Xba I 部位と、他端にある Hind III 部位により指定されるコドンを理由に変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 5) は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に 10 ~ 50 のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは 16 ~ 30 のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは 12 ~ 30 のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは 15 ~ 25 のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性な種に由来するレブリコンとコントロール配列とを含む。このベクターは通常レブリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌 (E. coli) は pBR322 を用いて容易に形質転換される (Bolivar ら、Gene, 2, 95- (1977) 又は Sambrook ら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第 2 版 (1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S. セレビジエ (S. cerevisiae) 又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばビシアバストリス (Pichia pastoris) が有用である。多細胞生物、例えば ATCC より入手できる SP2/0 又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスマドは pSV2neo 及び pSV2gpt (ATCC) : pSVL 及び pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1 / pML2d (International Biotechnology, Inc.) である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えば Sambrook ら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構造は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成／細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レブリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされうる (シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

特表平7-503622 (5)

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換DNA技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、実験生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この意図において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしもそれらが培養培地の中に分離されるなら、この一本鎖の多価抗体は紫外線により縮締されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで紫外線、抗原アフィニティーコロマトグラフィー又はイオン交換コロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル通過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体(refractile bodies)、通常封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HClによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物学活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)により測定できうる。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好適な免疫組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表面に上に発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の免疫組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

略語

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	[1, 3-ビス(ヒドロキシメチル)-メチルアミノ]プロパン
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖Fvダイマー

IEF	等電点電気泳動
Kbs	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴタクレオチド
PAC	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
psCPV	SCPVをコードするDNA配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドテシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)
TTBS	ツイーン20洗浄液
V _h	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V _l	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン
抗体	CC49: ヒト脛筋間連鎖タンパク質72(TAG-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

CC49PAB: 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scFv: ベブチドリンクーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Pv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後の数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Fv6は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンクーにより連結されている、2本のCC49ドメインと2本のV_hドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V_h(L)とV_h(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHHL, LHLH, LLHH, HLLH, HLHL及びHHLH。

プラスミド

pSCPV_UHN: 25のアミノ酸リンクーにより連結されている、CC49の可変領域とCC49可変重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHHL: CC49scFv2 LHLH又はLHHL生成物のそれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

実施例

一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版(1989)及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴタクレオチドの合成及び精製

オリゴタクレオチド(オリゴ)は全て、標準のβ-シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 391 DNA合成装置のいづれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55°Cで8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバボレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40μlの滅菌水の中に再懸滴させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1μlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65°Cで2時間かけて溶離させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム (Millipore, Bedford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶離することによって行った。その溶離の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD₂₆₀) での光学密度を測定することにより決定した。

新規酵素消化

新規酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN) の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムプロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Union Carbide Corp., Chicago) の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置 (Hoefer Scientific Instruments,

CA) を用いて透析させた。サンプル容量を Speed Vac濃縮器 (Seavant Instruments, Inc., NY) で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850~857 (1986)に実質的に記載の通りに調製した TAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイターブレート (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのブレートを PBS中の1%の BSAで31°Cで1時間ブロックし、次いで200μlの PBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25μlの試験抗体及び25μlのビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのブレートを31°Cで30分インキュベートした。ブレートに結合した TAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる競合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールは PBS中の1%の BSA及び/又は滅菌LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) を加え、そしてそのブレートを31°Cで30分インキュベートした。そのブレートを更に3回洗った。50μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corporation, Manlo Park, CA) を用い404~450 nmでの光学密度スキャニングに

より測定した。scFv2の場合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル (20μl) を、非還元用サンプル調製バッファー (Seprasoil 1 (Integrated Separation Systems (ISS), Natick, MA) の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド (Daiichi Minigel) にその製造者の仕様 (ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置 (ISS) を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており (Mid Range Kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタメートデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドライザ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ96,000、55,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュブリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファー#1 (0.3Mのトリス-HCl, pH 10.4) の中で15~20分平衡にした。Immobilion-P, PVDF (ポリビニリデンジクロリン) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファー#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一度の陽極バッファー#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 連紙のシートを陽極バッファー#1の中に浸し、そしてその電

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファー#2 (25mMのトリス、pH 10.4) の中に浸した別の連紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極バッファー (40mMのグリシン中の25mMのトリス-HCl, pH 9.4) の中に浸した連紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定常電流 (初期電圧は8~20ボルトに範囲した) を用いて30分で達せられた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング液 (トリス緩衝食塩水(TBS) 中の1%の牛血清アルブミン(BSA) (Sigma, St. Louis, MO)) を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL) より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液 (TTBB) を用いて5分間3回洗った。TTBBを調製するには、0.5mlのツイーン20 (Sigma) をTBSのリッター当たり混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化 FAID 14溶液とした (10μg/20mlの抗体バッファー)。抗体バッファーは100mlのTTBS当り1gの BSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファーの中で1:500 希釈率のアルカリホスファターゼの結合されたストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファー (20ml) の中で2分洗った。このバッファーは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl₂、H₂O、pH 9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

ての基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウエスタン免色剤として市販されている。免色のため、それぞれ120μlを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで免色液からそれらを水で洗い流した。

ビオチニル化 FAID 14

FAID 14は、CC48に対して特異的な、ATCC No.CRL10256として寄託されているネズミの抗-IgG1タイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14を Nygene Protein Aアフィニティカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただしあらバッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH~7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1mg、水の中で100μl)を100μlの0.1MのNa₂CO₃、pH 9.6と混合した。ビオチニル-e-アミノカプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20μl)をFAID 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Supercase 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル通過により除去した。0.8μl/minの流速で、ビオチニル化 FAID 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をブールし、そして4℃で保存し、そしてCC48V₁及びV₂CDRにより決定

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR (Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に与するからである。

実験的にpIを、Isogelアガロース IEFプレート、pH域3~10(FMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシニアニン、β-ラクトグロブリンB、牛皮膚アンヒドライゼ、ヒト炭酸アンヒドライゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レントチルレクチン及びチトクロームCを含み、それとのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び8.60である。ゲルを、FMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

CC48抗体の定量

IgG, scPv2の種および单量体scPvを含む精製CC48抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS 分光光度計E552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E_m)は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_m = (Trp \text{数}) \times 5,500 + (Tyr \text{数}) \times 1,340 + ((Cys) 2 \text{数}) \times 150 + (Phe \text{数}) \times 10$$

これらの値は、D.B.Wattaufer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

高性能液体クロマトグラフィー

CC48scPv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全量にチタンまたはテフロン製配管を用いた LKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定された UV CORD SII 2236型検出装置および2211型 SuperRac fraction collectorで構成されている。

サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド様の(pSCFVUHM) : 100ピコモルのプライマー: 1μlのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク所在のPBC社)のAmpli-Tagポリメラーゼ: 16μlの10mM dNTPおよび10μlの10×緩衝液(両者ともにPEKキットに提供されている);ならびに合計容積を100μlにするのに充分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94℃で20~45秒間のDNAの変性: 52~60℃で0.5~1.5分間のアニーリングおよび72℃で0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴタクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の390A型もしくは391型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20μl)は最初18℃でインキュベートし、次いで一夜4℃まで徐々に冷却した。

形質転換

形質転換は、100μlのStratagene社の大腸菌(E.coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由來のDNA(1~5μl)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を繰りながらルリアプロス(LB)中で37℃で1時間再生させ、続いて、pSCPVUHM, p48LHLHもしくはp49LHLHに用いる20μg/mlのクロラムフェニコール含有(CAM20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由來のその後の構築物に用いる100μg/mlアンビシリソ(CAM100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニーブレッッププラスミド製造キットを用いて、海太圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBプロス培養液から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドの検定

p48LHLHおよびp49LHLHと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために検査した。p48LHLHを含有する宿主細胞は、V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄で表すことができるポリペプチドを產生した。ここでV₁とV₂はCC48抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記 SEQ ID NO: 5の配列を有する

特表平7-503622 (B)

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Asp

p48LHHLを含有する宿主細胞は、V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄で表すことができるポリペプチドを产生した。ここでV₁とV₂はCC48抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびV₃は上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC48V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄(p48LHHL)のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC48V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄(p48LHHL)のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301HTの構造

pSL301HTの構造を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(Bacillus licheniformis)のペニシリナーゼP(pepP)ターミネーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取り出、電気泳動を行った後、4.5%ボリアクリルアミドゲルから切取り、電気溶出させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター:pSL301(米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出願の米国特許第07/935,695号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCFV UHMは、pepPプロモーターのタクレオチド配列:固有NcoI制限部位:CC48V₁領域: HindIII制限部位:25個のアミノ酸のリンカー:固有XbaI制限部位:CC48V₂領域:NheI制限部位:pepPターミネーター;およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpepPプロモーターとpepPターミネーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3μL)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜培養させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。pepPターミネーター、インサートを含有するボテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサーズバーグ所在)のT7 Quickprime ³²P DNA標識キットと、Boluwelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解放法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、pepP-NheI-BamHIターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301Tと命名し、次いでCC48VHに対するタクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するに選択した。NheI-BamHI pepPターミネーターをpSL301T中に配置した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のボリリンカーリー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV₁とV₂の領域を統合して構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に附加されると、Eco47IIIは各場合に破壊され、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V₁配列は、PCR增幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3'オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA TTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP6B: 5' -TAAA TTC GCA GAT GAC GCA AGG AAA GAC GCA CCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AGG GAT GAC GGC AGG AAA GAT CTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG
TCT-G'

またオリゴ SCP6Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp 8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC48VH標的でアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIとNheIで消化し次いでpSL301HT Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(8μL)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXbaI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSCP1を用いて決定し、正しい配列(図7のタクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のタクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV₁サブユニット(bp1544~1963、図7)は、5' オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP8aを用いかつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのタクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TTC GCA GAT GAC GCA AGG AAA GAC GCA CCT AAA AAA GAC GAT
GCC AAA AGG GAT GAC GGC AGG AAA GAT CTT GAG ATT GTG ATG TCA CAG TCT
CC

SCP5: 5' -TAAA TTC ACC ACCA ACC CCT TAG TCA GCA GAC CCT GAC TGA CCT-3'
下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV₂DNAを、4%のPAG、電気溶出、エタノールによる沈殿および20μL水への溶解によって精製した。そのV₂配列をXbaIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いで精製されたpSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC48V₂インサートを含有していることを示す候補的クローンをNheIおよびXbaI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical(USB)社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、XbaI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC48VHを用いて、DNAの配列決定を行って、CC48V₂の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC48V₂配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-RHHTおよびpSL301-HLHTの両者を精製するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをこに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12)およびCC48V₂(SEQ ID NO: 13)のオリゴタクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC48VH: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

実施例1 p48LHHLの構造

pSL301HT(5μg)を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC48V₂挿入フラグメントは、5' オリゴとしてSCP6Bを用いかつ

下線をつけたヌクレオチドは *Fsp*I 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18)は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC
 CAG CTT CGT CCC-3'

下線をつけた最初の一組は *Nhe*I 部位に相当し、もう一つの組は *AfI* II 部位に相当する。SCP70のヌクレオチド 8~76はリンカーをコードし(図 7 のヌクレオチド 1544~1612)、一方 V_L にアニールするヌクレオチド 77~89は図 7 の 1613~1635に相当する。プライマー SCP8aは、その 5' 末端の短かいテール、*Nhe*I 制限部位、終止コドン、*AfI* II 制限部位および V_L の最後の 21個の塩基を含有している。*Fsp*I と *Nhe*I による消化の後、この得られた 420bp のインサートを精製して精製 pSL301HHLベクターの *Nhe*I と *Eco*47IIIの部位に連結し、候補的なクローニングを *Nhe*I と *Xba*I でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ 49LFR2 (-) と SQPIで配列が決定されて、pSL301HHL中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 19)は下記のとおりである。

49LFR2 (-) : 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミド pSL301HHLを *Xba*I および *Nhe*I で消化し、精製し、得られた 1178bp V_L - リンカー - V_L - リンカー - V_L セグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHLHを製造した。なおこの pSCPV UHMは同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4 μ L部分)を用いてコンピテンント大腸菌 AG1 細胞(STRATAGENE社)を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地区を有するプラスミドを含有する単クローニングを、p49LHLHを含有させるために選択した。p49LHLHは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V_L -L- V_L -L- V_L または CC49scFv2 (LHLH)の penP プロモーターとヌクレオチ

ド配列を含有している。

実験例 2: p49LHLHの構造

p49LHLHの構造を図 11に図式的に示す。リンカー V_L のサブユニットを 5' オリゴの SCP7b と 3' オリゴの SCP8で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC
 ACC ACC ACC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド 8~76)は図 6 のリンカーをコードし(ヌクレオチド 1124~1192に相当する)および図 6 の V_L のヌクレオチド 1193~1215に相当する、PCRに対する pSCPV UHM(即ちヌクレオチド 77~89)にアニールした。

SCP8は、*Nhe*I 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と *Eco*47III 部位(第二の下線をつけたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次の V 領域を受けるための pSL301HHLを作るのに必要な制限部位である。SCP8のヌクレオチド 18~23は図 6 のヌクレオチド 1532~1537(リンカーの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド 24~46は、PCRにおける SCP9のアニーリング領域である図 6 に示すヌクレオチド 1508~1531に相当する。プラスミド pSL301HHLを *Eco*47III と *Nhe*I で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め *Fsp*I と *Nhe*I で処理され精製された、PCRからのリンカー - CC49 V_L DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3 μ L)を用いて大腸菌 AG1 コンピテンント細胞を形質転換し、次いで正しい *Xba*I - *Nhe*I の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られた pSL301HHLクローニング中に PCRの誤まり

と欠失があるということを示した。図 6 にみられるヌクレオチド 1533~1537に相当する 5 個の塩基の欠失がまとめられ、そして T であるべきはずのヌクレオチド 1531は DNA配列のデータから確認したところ実際には C であった。得られた配列は、

5' ...GAAGCCCTT...であった。

ここで下線をつけた配列は偶然に *Eco*47III 部位を形成した。図 6 の AGCCCTの配列はヌクレオチド 1530, 1531, 1532, 1538, 1539および 1540に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴ SCP8C の末端に 5 塩基の欠失を組み込むことによって pSL301HHLTを製造した。

SCP6C: 5' -TAAGCCCTCATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA
 GGACGACGGCAAAAAAGATGATGCAAAAGGATCTGG
 AGCTTCAGTTGCCAGCAGCTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列は *Eco*47III 部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは 5' オリゴとして用いられ一方 SCP10は 3' オリゴとして用いられて、リンカー CC49 V_L セグメントが生成する。

SCP10 のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 28)は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TCC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA
 CTG AGG TT-3'

SCP10中の下線をつけた配列は図 6 のヌクレオチド 1558~1563に見られる *Nhe*I 部位に相当する。この場合、PCRインサートは *Nhe*I だけで消化され次いで精製される。ベクター(pSL301HHLT)は *Eco*47III 部位(先に形成されている)および *Nhe*I 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μ L)を使ってコンピテンント AG1 細胞を形質転換した。この形質転換細胞を LB-AMP100プレート上にプレートし次いで候補的クローニングを *Xba*I と *Nhe*I でスクリーニングした。正しい大きさ

の DNAを有する 3 個のクローニングを得た。これらのクローニングのうちの 2 個は、オリゴ 49VLCDR3 (+) および SQPIを用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCDR3 (+) の DWQ ID NO: 24)は下記のとおりである。

49VLCDR3 (+) : 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローニングが得られ、そして図 6 のヌクレオチド 1533~1563からの配列が確認され、正しい pSL301HHLHクローニングを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL301HHLT(5 μ g)を *Nhe*I と *Xba*I で消化し、次いで V_L -L- V_L -L- V_L 配列を有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM(5 μ g)を *Xba*I と *Nhe*I で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部(4 μ L)を使ってコンピテンント大腸菌 AG1 細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物を LB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p49LHLHに対する代表的なクローニングを、正しい制限酵素地区(図 10参照)および TAG-72に対する生物活性に基づいて選択した。

実験例 3 CC49 scFv2のLHLHとLHLHが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の回分を、p49LHLHと p49LHLHの両者の 1.0L の一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を 250mL づつの 4 部分に分割し、Sorvall GS-8 ロータで 10 分間 5000rpm で遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する 10mM トリス-HCl pH 7.3 からなる 100mL 中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100mL の 30mM トリス-HCl pH 8 で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40W/v%

特表平7-503622 (10)

のスクロースを含有する50mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞(hypertonic cell)を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5mM MgCl₂中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の面分を含有する上皮細胞を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentriprep 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたはp49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショケート(shockate)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HR 10/30 HPLCカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。競合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をプールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回交換ながら80000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料をPharmacia社のMono Q HR 5/5アミオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の面分の、二つのSDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマーシーブリリアン

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウエスタン分析(プローブ抗体としてビオチニル化PAID 14を使用)に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いでPharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの面分の5と6は、SDS-PAGE法およびELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの面分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで面分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S面分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は0.6mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで溶出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

等電点電気泳動

精製物の等電点(pI)はDNASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のコンピュータプログラムProtein-Titratorを使用して予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC Bioproducts社(米国、メイン州、ロックランド所在)のIso gel IEFプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記IEFを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチャモンド所在)の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V(固定)および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社のIEF標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドライゼ、ヒトカルボニックアンヒドライゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65、5.10、6.00、6.50、7.00、7.50、7.8、8.00、8.20および8.6であった。ゲルはFMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTARプログラムによって両方のscFv2の種のpI値として8.1の値が予測された。純品の生成物に対し单一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の6.9の位置にみとめられた。

IgG、scFv2(LHLH)および(LHHL)のよう精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光的に測定することによって定量した。モル吸光係数 ϵ_m は各々、先に引用したWetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG、CC49scFv2LHLH、CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvの ϵ_m^{280nm} (280nm)値はそれぞれ1.49、1.65、1.65および1.71であった。

実施例4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単体量scFvと比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によってELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合} - \text{試料競合取り値} (\text{OD } 405-450\text{nm})}{\text{ゼロ競合} - 100\% \text{競合}} \times 100$$

*ゼロ競合(zero competition)値は、1% BSAをビオチニル化CC49(3×10~14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方100%競合値はビオチニル化CC49IgGと混合したCC49IgGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図IIに示す。試料の吸光度値は405nm~450nmで測定した。3回の競合取り値の平均値を使

用した。最初に試料(25μL)を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10モルの結合部位/孔で塗布した。ビオチニル化CC49(4μg/μL:1:20,000に希釈、25μL使用)で試料を1/2濃度で希釈した。連続希釈法(1:2)を行った。両方の形態のscFv2はIgGにはやや等しい(図II参照)。別の試験で、CC49scFv単体量をFabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらはTAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単体量の種に比べて全IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、そのCC49IgGの親と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存のIgG分子に比べて、本発明の化合物は多量回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍:組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の実の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

証書(内容に変更なし)

FIGURE 1

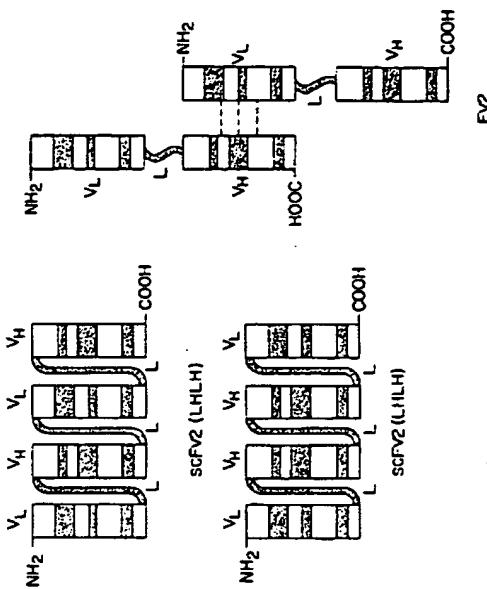


FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
CGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GCC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
GAG GGC CTC GAA TGG ATT GGA TAT TTG TCT CCC GGA AAT CAT
GAT TTT AAA TAC ATT GAG AGG TTC AAG GGC AGG GCA CTC
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC
AGC CTC AGA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA
TCC CTC ATT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
GTC TCC TCA

FIG. 5

Clu Val Gin Leu Gin Gin Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gin Asn Pro Glu Gin Gly Leu
 Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr
 Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 Asp Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
 Gly Gin Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

FIG. 2

GAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA
GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC ACT CAG AGC
CTT TTA TAT AGT GGT ATG CAA AAG ACG TAC TTG CCC TGG TAC
CAG CAG AAA CCA CGG CAG TCT CCT AAA CTG CTC ATG ATT TAC TGG
CCA TCC GCT AGG CAA TCT GGG TGC CCT GAT CGC TTC ACA GCG
AGT GGA TCT CGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC ACT GTG
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC ACC TTC CGT GCT GGG ACC AAG TCT GTG CTC
AAG

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gin Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Glu Gln Lys
 Pro Gly Cln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Lys Ala Arg
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
 Val Tyr Tyr Cys Gln Cys Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 Ala Gly Lys Leu Val Leu Lys

FIGURE 6

FIG. 6D

FIG. 6B

Terp Tyr Gln Gln Lys Pro Gln Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp	50	Terp Tyr Gln Gln Lys Pro Gln Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp	526
TTC TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTC CTC ATT TAC TGC	526	TTC TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTC CTC ATT TAC TGC	526
Asn Ser Ala Gln Gln Ser Gln Val Pro ASP Arg Phe Thr Gln Ser Gly	574	Asn Ser Ala Gln Gln Ser Gln Val Pro ASP Arg Phe Thr Gln Ser Gly	574
GAA TCC GCT AGG CAC GAA TCT GGG GTC CCF DAT CGG TCC ACA GGC AGT	574	GAA TCC GCT AGG CAC GAA TCT GGG GTC CCF DAT CGG TCC ACA GGC AGT	574
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Val Lys Thr Glu Asp	622	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Val Lys Thr Glu Asp	622
TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ATC AGC ACT GTG AAG ACT GAA GAC	622	TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ATC AGC ACT GTG AAG ACT GAA GAC	622
Ile Ala Val Ile Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe	670	Ile Ala Val Ile Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe	670
CTG GCA GTT TAT TAC TAC TAT CAG CAG TAT TAT ACC TAT CCC CTC ACC TTC	670	CTG GCA GTT TAT TAC TAC TAT CAG CAG TAT TAT ACC TAT CCC CTC ACC TTC	670
Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Val	718	Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Val	718
GCT GGT GGG AGC AAC CTC GTC GTC AAC CTT ACT GCG DAT GCG GAA AAA	718	GCT GGT GGG AGC AAC CTC GTC GTC AAC CTT ACT GCG DAT GCG GAA AAA	718
Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys	130	Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys	130
Asn GAT GCT GCG AAC AAC CAT GAT GCG AAC AAC CAT GAT GCG AAC AAC	130	Asn GAT GCT GCG AAC AAC CAT GAT GCG AAC AAC CAT GAT GCG AAC AAC	130

60

330	Lys Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp AAA CTC CTC ATT TAC TGG CCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GRC CCT GAT	340	
350	Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser CGC TTC AGA GGC ACT GGA TCT GGG AGC TAC TGC ACT GTC TCC ATC AGC	360	
370	Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln TTT TTT AGT GTG AAC ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT TAT TAC TAT	380	
380	Arg TAT Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Lys Leu AGC TAT AGC TAT CTC ACC TCC GGT GGG ACC AAC CTC GTC CAG CTA	390	
400	Ser Asp Asp GAC DCT GAT GCT AAC AAG GAC GGC GCA AAA AAG GAC GAC GCA AAA	410	
410	Lys Asp Asp Asp Asp Asp Lys Lys Asp Lou Glu Val Glu Val Glu Val AAG CAT GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAG GGT CAG TGC CAG TCT GAC	420	
430	Lys Asp Asp Asp Asp Asp Lys Lys Asp Lou Glu Val Glu Val Glu Val AAG CAT GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAG GGT CAG TGC CAG TCT GAC	440	
450	Lys Asp Asp Asp Asp Asp Lys Lys Asp Lou Glu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala AAG CAT GAT GCA AAA AAG GAT CTC GAG GGT CAG TGC CAG TCT GAC	460	

۱۵۵

抄録(内容に変更なし)

FIGURE 7

CC49 V-L-VH-L-VH-L-VL-DNA/RUP³³ノ配列

5'-C TCA TCT TCG ACA GCT TAT CAT CGA TCA ATT CCA TCA CTI CCC TCC 46
 GTT CAT TTG TCC CCG CTC GAA AGC TCA TCA TTG CCT TCC GAA AAA 91
 AGG GTC GCA TTT AAA TCT TAC ATA TAT AAC TAC TTC AAA GAC TAC ATT 142
 TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CGG CTG AAA GAT CCT AGC TAC CAA TTA 190
 TGG TTT CCT GAT TGT TCA AGG CAT AGC ACT GCA ACT GTC GAA GAA 238
 GTC CCT CAT CTG CCT AGC ATC AAT CAA TTC AAA CGG AGG GAG AGG 286
 PEPTRI-TAT AGG TTG TCC CTC AAC TGT TCC CTC CTC TGT TGT TGT TGT 334
 ATT TGT ATG AAA TAC TCA TGT TCA AGG CCT AGC GCA GGC AGG GAA 382
 Leu Ala Ala Gln Pro Ala Ala Gln Pro Thr Val Leu Leu Leu Leu Leu 410
 Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Tle Val Met Ser Gln Ser Pro 430
 CTC GCT GCC CAA CCC AGC DAC ATT GTG ATG TCA CAG TCT CCA 432
 Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gln Gln Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys 439
 TCC TCC CTA CCT GTC TCA GTC GTC GAG AGG ATT ACT TGT ACC TGC AAG 470

FIG. 6F

450 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gin Asn
 TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTC AAA CAG AAC 1726
 460 Pro Glu Gin Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp
 CCT GAA CAG GGC CTC GAA TCG ATT GCA TAT TTT TCT CCC GAA AAT GAT 1774
 470 Asp Phe Lys TTT Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala
 GAT TTT ATT AAC TAC ATT GAA AGG TTC AGG GAG GCC ACA CTC ACT GCA 1822
 480 Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gin Leu Alan Ser Leu Thr Ser
 GAC AAA TCC TCC AGC ACT GTC TAC CTC AAC TGC CTC AGC CTC ACA TCT 1870
 490 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Alan Met Ala Tyr
 GAC CAT TCT GCA GTG TAT TCC TGT ATT ACA AGA TCC CTC AAT ATG GTC TAC 1918
 500 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser *** NH₂
 TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC ACC TCC TCA TAA AAA GCT GAT 1966

FIG. 6G

510 GAA TCC GTC AAA AGA TCA TCT TAC ATA AAC TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014
 SQP1-TCT AGT AGA ATG TAT TTC AGT PEPTRI-TAT TCC AGT GAA CCA CTA GTT
 CAT ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TCT ATC TTT 2062
 AAA GAT CAT GTG AAG AAA AAC GGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC 2110
 GGG TTT TTG TCG AAA TCA TAG GCG ATT GGG TTC GAT TGT GAC AAA ATT 2158
 BamH I
 CCG ATC C-3'

FIG. 7B

30 Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gln Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
 TCC AGT CAG ACC CTT TTA TAT AGT GGT ATT CAA AAG ANC TAC TGT GCC 478
 40 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gln Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Trp
 TGG TAC CAG AAA CCA CGG CAG CTC ATT TAC TGG 526
 50 Ala Ser Ala Arg Clu Ser Gln Val Pro Asp Arg Phe Thr Gln Ser Gln
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GCG GTC CCT GAT CGC TTC AGA GGC AGT GGA 574
 60 Ser Gln Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp
 TCT GGG AGA GAT TTC ACT CTC TCC ATT ACC AGT GTO AGC ACT GAA GAC 622
 70 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe
 CTG GCA CCT TAT TAC TGT TAC TGT TAT AGC TAT ACC CTC AGG TTC 670
 80 100
 90 130
 110 140
 120 150
 130 160
 140 170
 150 180
 160 190
 170 200
 180 210
 190 220
 200 230
 210 240
 220 250
 230 260
 240 270
 250 280
 260 290
 270 300
 280 310
 290 320
 300 330
 310 340
 320 350
 330 360
 340 370
 350 380
 360 390
 370 400
 380 410
 390 420
 400 430
 410 440
 420 450
 430 460
 440 470
 450 480
 460 490
 470 500
 480 510
 490 520
 500 530
 510 540
 520 550
 530 560
 540 570
 550 580
 560 590
 570 600
 580 610
 590 620
 600 630
 610 640
 620 650
 630 660
 640 670
 650 680
 660 690
 670 700
 680 710
 690 720
 700 730
 710 740
 720 750
 730 760
 740 770
 750 780
 760 790
 770 800
 780 810
 790 820
 800 830
 810 840
 820 850
 830 860
 840 870
 850 880
 860 890
 870 900
 880 910
 890 920
 900 930
 910 940
 920 950
 930 960
 940 970
 950 980
 960 990
 970 1000
 980 1010
 990 1020
 1000 1030
 1010 1040
 1020 1050
 1030 1060
 1040 1070
 1050 1080
 1060 1090
 1070 1100
 1080 1110
 1090 1120
 1100 1130
 1110 1140
 1120 1150
 1130 1160
 1140 1170
 1150 1180
 1160 1200
 1170 1210
 1180 1220
 1190 1230
 1200 1240
 1210 1250
 1220 1260
 1230 1270
 1240 1280
 1250 1290
 1260 1300
 1270 1310
 1280 1320
 1290 1330
 1300 1340
 1310 1350
 1320 1360
 1330 1370
 1340 1380
 1350 1390
 1360 1400
 1370 1410
 1380 1420
 1390 1430
 1400 1440
 1410 1450
 1420 1460
 1430 1470
 1440 1480
 1450 1490
 1460 1500
 1470 1510
 1480 1520
 1490 1530
 1500 1540
 1510 1550
 1520 1560
 1530 1570
 1540 1580
 1550 1590
 1560 1600
 1570 1610
 1580 1620
 1590 1630
 1600 1640
 1610 1650
 1620 1660
 1630 1670
 1640 1680
 1650 1690
 1660 1700
 1670 1710
 1680 1720
 1690 1730
 1700 1740
 1710 1750
 1720 1760
 1730 1770
 1740 1780
 1750 1790
 1760 1800
 1770 1810
 1780 1820
 1790 1830
 1800 1840
 1810 1850
 1820 1860
 1830 1870
 1840 1880
 1850 1890
 1860 1900
 1870 1910
 1880 1920
 1890 1930
 1900 1940
 1910 1950
 1920 1960
 1930 1970
 1940 1980
 1950 1990
 1960 2000
 1970 2010
 1980 2020
 1990 2030
 2000 2040
 2010 2050
 2020 2060
 2030 2070
 2040 2080
 2050 2090
 2060 2100
 2070 2110
 2080 2120
 2090 2130
 2100 2140
 2110 2150
 2120 2160
 2130 2170
 2140 2180
 2150 2190
 2160 2200
 2170 2210
 2180 2220
 2190 2230
 2200 2240
 2210 2250
 2220 2260
 2230 2270
 2240 2280
 2250 2290
 2260 2300
 2270 2310
 2280 2320
 2290 2330
 2300 2340
 2310 2350
 2320 2360
 2330 2370
 2340 2380
 2350 2390
 2360 2400
 2370 2410
 2380 2420
 2390 2430
 2400 2440
 2410 2450
 2420 2460
 2430 2470
 2440 2480
 2450 2490
 2460 2500
 2470 2510
 2480 2520
 2490 2530
 2500 2540
 2510 2550
 2520 2560
 2530 2570
 2540 2580
 2550 2590
 2560 2600
 2570 2610
 2580 2620
 2590 2630
 2600 2640
 2610 2650
 2620 2660
 2630 2670
 2640 2680
 2650 2690
 2660 2700
 2670 2710
 2680 2720
 2690 2730
 2700 2740
 2710 2750
 2720 2760
 2730 2770
 2740 2780
 2750 2790
 2760 2800
 2770 2810
 2780 2820
 2790 2830
 2800 2840
 2810 2850
 2820 2860
 2830 2870
 2840 2880
 2850 2890
 2860 2900
 2870 2910
 2880 2920
 2890 2930
 2900 2940
 2910 2950
 2920 2960
 2930 2970
 2940 2980
 2950 2990
 2960 3000
 2970 3010
 2980 3020
 2990 3030
 3000 3040
 3010 3050
 3020 3060
 3030 3070
 3040 3080
 3050 3090
 3060 3100
 3070 3110
 3080 3120
 3090 3130
 3100 3140
 3110 3150
 3120 3160
 3130 3170
 3140 3180
 3150 3190
 3160 3200
 3170 3210
 3180 3220
 3190 3230
 3200 3240
 3210 3250
 3220 3260
 3230 3270
 3240 3280
 3250 3290
 3260 3300
 3270 3310
 3280 3320
 3290 3330
 3300 3340
 3310 3350
 3320 3360
 3330 3370
 3340 3380
 3350 3390
 3360 3400
 3370 3410
 3380 3420
 3390 3430
 3400 3440
 3410 3450
 3420 3460
 3430 3470
 3440 3480
 3450 3490
 3460 3500
 3470 3510
 3480 3520
 3490 3530
 3500 3540
 3510 3550
 3520 3560
 3530 3570
 3540 3580
 3550 3590
 3560 3600
 3570 3610
 3580 3620
 3590 3630
 3600 3640
 3610 3650
 3620 3660
 3630 3670
 3640 3680
 3650 3690
 3660 3700
 3670 3710
 3680 3720
 3690 3730
 3700 3740
 3710 3750
 3720 3760
 3730 3770
 3740 3780
 3750 3790
 3760 3800
 3770 3810
 3780 3820
 3790 3830
 3800 3840
 3810 3850
 3820 3860
 3830 3870
 3840 3880
 3850 3890
 3860 3900
 3870 3910
 3880 3920
 3890 3930
 3900 3940
 3910 3950
 3920 3960
 3930 3970
 3940 3980
 3950 3990
 3960 4000
 3970 4010
 3980 4020
 3990 4030
 4000 4040
 4010 4050
 4020 4060
 4030 4070
 4040 4080
 4050 4090
 4060 4100
 4070 4110
 4080 4120
 4090 4130
 4100 4140
 4110 4150
 4120 4160
 4130 4170
 4140 4180
 4150 4190
 4160 4200
 4170 4210
 4180 4220
 4190 4230
 4200 4240
 4210 4250
 4220 4260
 4230 4270
 4240 4280
 4250 4290
 4260 4300
 4270 4310
 4280 4320
 4290 4330
 4300 4340
 4310 4350
 4320 4360
 4330 4370
 4340 4380
 4350 4390
 4360 4400
 4370 4410
 4380 4420
 4390 4430
 4400 4440
 4410 4450
 4420 4460
 4430 4470
 4440 4480
 4450 4490
 4460 4500
 4470 4510
 4480 4520
 4490 4530
 4500 4540
 4510 4550
 4520 4560
 4530 4570
 4540 4580
 4550 4590
 4560 4600
 4570 4610
 4580 4620
 4590 4630
 4600 4640
 4610 4650
 4620 4660
 4630 4670
 4640 4680
 4650 4690
 4660 4700
 4670 4710
 4680 4720
 4690 4730
 4700 4740
 4710 4750
 4720 4760
 4730 4770
 4740 4780
 4750 4790
 4760 4800
 4770 4810
 4780 4820
 4790 4830
 4800 4840
 4810 4850
 4820 4860
 4830 4870
 4840 4880
 4850 4890
 4860 4900
 4870 4910
 4880 4920
 4890 4930
 4900 4940
 4910 4950
 4920 4960
 4930 4970
 4940 4980
 4950 4990
 4960 5000
 4970 5010
 4980 5020
 4990 5030
 5000 5040
 5010 5050
 5020 5060
 5030 5070
 5040 5080
 5050 5090
 5060 5100
 5070 5110
 5080 5120
 5090 5130
 5100 5140
 5110 5150
 5120 5160
 5130 5170
 5140 5180
 5150 5190
 5160 5200
 5170 5210
 5180 5220
 5190 5230
 5200 5240
 5210 5250
 5220 5260
 5230 5270
 5240 5280
 5250 5290
 5260 5300
 5270 5310
 5280 5320
 5290 5330
 5300 5340
 5310 5350
 5320 5360
 5330 5370
 5340 5380
 5350 5390
 5360 5400
 5370 5410
 5380 5420
 5390 5430
 5400 5440
 5410 5450
 5420 5460
 5430 5470
 5440 5480
 5450 5490
 5460 5500
 5470 5510
 5480 5520
 5490 5530
 5500 5540
 5510 5550
 5520 5560
 5530 5570
 5540 5580
 5550 5590
 5560 5600
 5570 5610
 5580 5620
 5590 5630
 5600 5640
 5610 5650
 5620 5660
 5630 5670
 5640 5680
 5650 5690
 5660 5700
 5670 5710
 5680 5720
 5690 5730
 5700 5740
 5710 5750
 5720 5760
 5730 5770
 5740 5780
 5750 5790
 5760 5800
 5770 5810
 5780 5820
 5790 5830
 5800 5840
 5810 5850
 5820 5860
 5830 5870
 5840 5880
 5850 5890
 5860 5900
 5870 5910
 5880 5920
 5890 5930
 5900 5940
 5910 5950
 5920 5960
 5930 5970
 5940 5980
 5950 5990
 5960 6000
 5970 6010
 5980 6020
 5990 6030
 6000 6040
 6010 6050
 6020 6060
 6030 6070
 6040 6080
 6050 6090
 6060 6100
 6070 6110
 6080 6120
 6090 6130
 6100 6140
 6110 6150
 6120 6160
 6130 6170
 6140 6180
 6150 6190
 6160 6200
 6170 6210
 6180 6220
 6190 6230
 6200 6240
 6210 6250
 6220 6260
 6230 6270
 6240 6280
 6250 6290
 6260 6300
 6270 6310
 6280 6320
 6290 6330
 6300 6340
 6310 6350
 6320 6360
 6330 6370
 6340 6380
 6350 6390
 6360 6400
 6370 6410
 6380 6420
 6390 6430
 6400 6440
 6410 6450
 6420 6460
 6430 6470
 6440 6480
 6450 6490
 6460 6500
 6470 6510
 6480 6520
 6490 6530
 6500 6540
 6510 6550
 6520 6560
 6530 6570
 6540 6580
 6550 6590
 6560 6600
 6570 6610
 6580 6620
 6590 6630
 6600 6640
 6610 6650
 6620 6660
 6630 6670
 6640 6680
 6650 6690
 6660 6700
 6670 6710
 6680 6720
 6690 6730
 6700 6740
 6710 6750
 6720 6760
 6730 6770
 6740 6780
 6750 6790
 6760 6800
 6770 6810
 6780 6820
 6790 6830
 6800 6840
 6810 6850
 6820 6860
 6830 6870
 6840 6880
 6850 6890
 6860 6900
 6870 6910
 6880 6920
 6890 6930
 6900 6940
 6910 6950
 6920 6960
 6930 6970
 6940 6980
 6950 6990
 6960 7000
 6970 7010
 6980 7020
 6990 7030
 7000 7040
 7010 7050
 7020 7060
 7030 7070
 7040 7080
 7050 7090
 7060 7100
 7070 7110
 7080 7120
 7090 7130
 7100 7140
 7110 7150
 7120 7160
 7130 7170
 7140 7180
 7150 7190
 7160 7200
 7170 7210
 7180 7220
 7190 7230
 7200 7240
 7210 7250
 7220 7260
 7230 7270
 7240 7280
 7250 7290
 7260 7300
 7270 7310
 7280 7320
 7290 7330
 7300 7340
 7310 7350
 7320 7360
 7330 7370
 7340 7380
 7350 7390
 7360 7400
 7370 7410
 7380 7420
 7390 7430
 7400 7440
 7410 7450
 7420 7460
 7430 7470
 7440 7480
 7450 7490
 7460 7500
 7470 7510
 7480 7520
 7490 7530
 7500 7540
 7510 7550
 7520 7560
 7530 7570
 7540 7580
 7550 7590
 7560 7600
 7570 7610
 7580 7620
 7590 7630
 7600 7640
 7610 7650
 7620 7660
 7630 7670
 7640 7680
 7650 7690
 7660 7700
 7670 7710
 7680 772

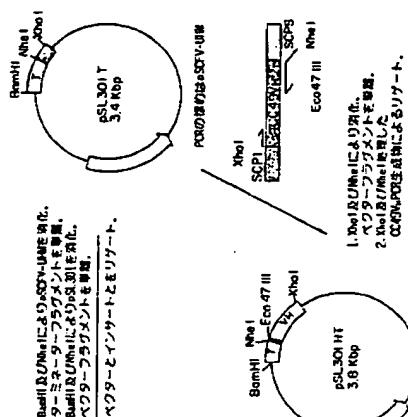
FIG. 7C

FIG. 7D

250	Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Lys Lys Asp Ala Ala	260	Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Lys Lys Asp Ala Ala
	GTC ACC GTC TCC TCA ACC GCA GAT GCA AAG AAA GAC GCA GCT		GTC ACC GTC TCC TCA ACC GCA GAT GCA AAG AAA GAC GCA GCT
270	Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Lys Asp Leu Lys Asp	280	VH Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Lys Asp Leu Lys Asp
	AAA AAA GAC GAT GCC AAA AAC AGC GAC AAC AAA GAT GAT GAT		VH GAT
290	Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Lys Pro Gln Ala Ser Val	300	Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Lys Pro Gln Ala Ser Val
	CAG TTC CAA CAG TCT GAC GCT GTC AAA CCT GGC GCT TCA GTC		CAG TTC CAA CAG TCT GAC GCT GTC AAA CCT GGC GCT TCA GTC
310	Lys Ile Ser Cys Leu Ala Ser Gln Tyr Thr Asp His Ala Ile	320	Lys Ile Ser Cys Leu Ala Ser Gln Tyr Thr Asp His Ala Ile
	AGG ATT TCC TCC AGG GCT TCT GAT TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT		AGG ATT TCC TCC AGG GCT TCT GAT TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT
330	Met Thr Val Lys Gln Asn Asn Pro Gln Gln Gln Ile Gln Trp Ile Gln Tyc	340	Met Thr Val Lys Gln Asn Asn Pro Gln Gln Gln Ile Gln Trp Ile Gln Tyc
	CAC TGG GTC AAA CAG AAC CCT GCA GAG GCA CAG GAC GTC GAA		CAC TGG GTC AAA CAG AAC CCT GCA GAG GCA CAG GAC GTC GAA
350	Phe Ser Pro Gln Asn Asp Asp Pro Lys Tyr Asn Gln Asp Phe Gln	360	Phe Ser Pro Gln Asn Asp Asp Pro Lys Tyr Asn Gln Asp Phe Gln
	TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC GAT GCG AAG TCC AAG		TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC GAT GCG AAG TCC AAG
370	Leu Asn Ser Leu Thr Ala Asp Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln	380	Leu Asn Ser Leu Thr Ala Asp Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln
	CTC AAC AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTC TCT GCA GCG		CTC AAC AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTC TCT GCA GCG
390	Arg Cys Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln	400	Arg Cys Thr Asn Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln
	AGG GCG CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC Acr GCG TCG GTC CAC		AGG GCG CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC Acr GCG TCG GTC CAC
410	BarH 1	420	BarH 1
	CGCC ATC C-3'		CGCC ATC C-3'

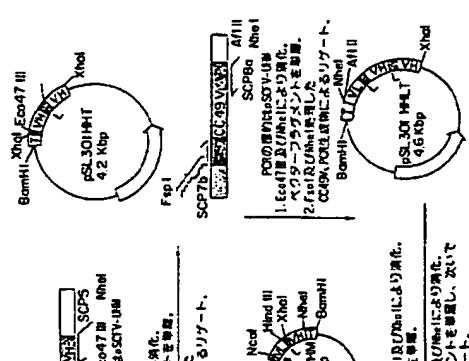
抄録(内容に変更なし)

FIGURE 8



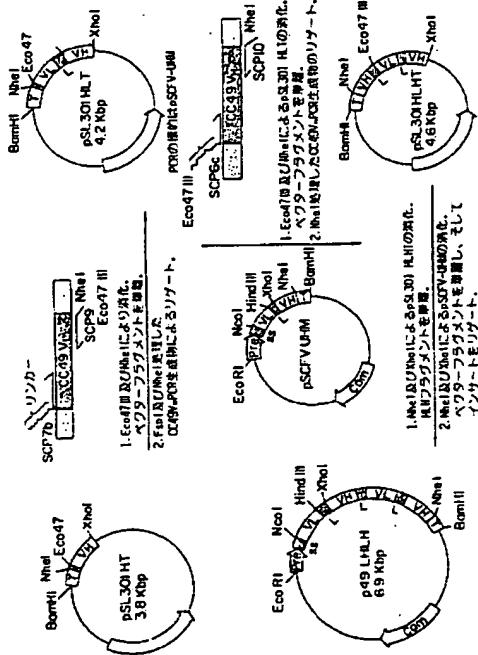
抄録(内容に変更なし)

FIGURE 9



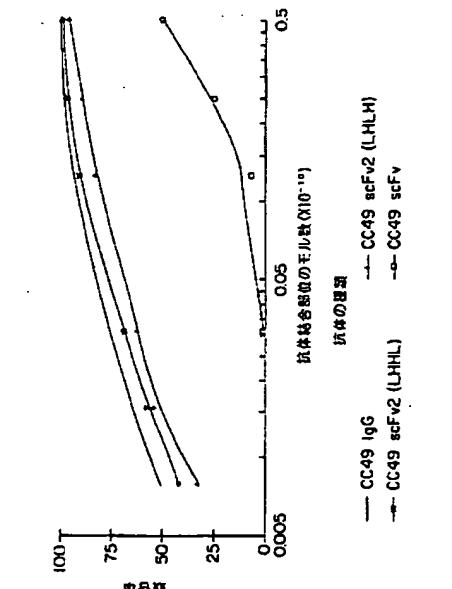
抄録(内容に変更なし)

FIGURE 10



抄録(内容に変更なし)

FIGURE 11



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁹
C 0 7 K 16/46
C 1 2 N 15/09
//(C 1 2 P 21/08
C 1 2 R 1:19)
識別記号 庁内整理番号 F I
Z N A 8318-4H

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//(C12P 21/08

C12R 1:19)

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 紙 替 正 古

明 顯 古

平成9年7月2日

多様の不規則体

特許庁長官 龍井英光

1 事件の表示

平成6年特許出願第5114437号

2 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名前 ヴィタ・ケミカル・カンパニー

3 代 表 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 成ノ内ビル

音和特許法律事務所 電話 03-5470-1930

氏名 安藤士(アンドウ)石(イシ) 勝(マサヒaru)

4 並正列表類名

明細書及び請求の範囲

5 並正列表項目名

明細書及び請求の範囲

6 補正の内容

(1) 明細書を別紙の通り補正します。

(2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。

7 並正署跡の記載

(1) 明細書



1通

(2) 請求の範囲

1通

本説明は、本願の多様抗体に関する。

抗体は、身体がウイルスであると判断する特定の抗原又は抗原に応答して免疫系により誘導されをイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスの上、抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四鎖体、又はその結合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は、一本の可変(V)、ドメインと、一本の定常(C)ドメインとより成り、一方、重鎖は一本の可変性ドメインと、一本以上の定常ドメインとより成る。重鎖及び軽鎖の両者に由来する、それぞれV₁及びV₂と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの構造を決定し、他方、定常(C)ドメインは複数のエフェクタ・機能をもたらす。

アミノ酸配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフランクされている3つの相補性決定領域(DR)を含んで成ることを示唆する、この時は可変領域ドメインの構造保存性を維持するものと考えられている。このDRは各々の員の結合性異性に応じて重複であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると既定されている。

抗体の基本構造は、一本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、1gGクラスは、一つの同一の抗原結合部位を有しており、一方、五量体IgMクラスは、同一の結合部位を有している。

同一の遺伝子列及び結合性異性を有するモノクローナル抗体は、許可及び治療用の両方として開発とされている。モノクローナル抗体は、既にされた手順に従い、マウスのリンパ母細胞マウスミエロマ細胞株との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に培養される。しかしながら、ヒトにおけるインビオ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒトを免疫により誘導されるヒトマウス抗体混合に並づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に出

来る抗体の名前と組合されたものが在扱 株式会社により分かれている。例えば、Suzanneら、J Immunol 137: 1066-1074 (1986) ; Seraf、Proc Natl Acad Sci USA 82: 214-218 (1985); Nishimura ら、Cancer Res. 47: 995-1005 (1987) ; および Lieber、Proc Natl Acad Sci USA 84: 2435-2445 (1987) を参照のこと。これらは種類固有抗原に対するモノクローナル抗体を用いている。典型的には、キヌミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキヌミ抗体はその大半分がヒトであるため、それらはキヌミ抗体よりも免疫原性が著しく低いものと見られる。

キヌミ抗体は、抗原結合にとって必要なのが、その典型的な構造を示す。オクタペプチド結合部位のうちの主要部分を構成する部位を示す。免疫学法又は免疫診断における抗体の利用のため、導的構造に適応し集中し、且つ結合する抗体構造を示すこと、及び本結合の性質が身体から適応されることが希望される。一般に、小さな操作フラグメントは高めの免疫活性を有しており、そして免疫活性よりも身体からより早く除去される。

抗体と互作用するには蛋白質及び多糖の可変領域であるため、一本のV₁と一本のV₂とにより一本の抗体フラグメント (Fab) が作成されており、これは6つのV₁を含み、それらはペプチドリンクマー (オキシペプチド 1-36, 778号) により連結されたV₁-L-V₂。オリベプチドを形成しており、ここでLはペプチドリンクマーを示している。V₁とV₂ドメインが互換V₁、L-V₂である場合が以前特許第5,132,405号に開示されている。

先述抗体にとっての最小限の2つの結合部位と見てはV₁は一つのそれを有するため、それは2以上の結合部位を含む抗体に比べて高い活性を有している。

見て、このオリベプチドの活性を高めるため、且つその抗原活性性を保持又は高めるため、また結合部位を有するV₁の構造を最適化することが有利である。加えて、導的構造上の別のエビトープの尾部を可変性とする、別の免疫ニフベクター最後の抗体ペース領域を可変性とする、又は右部もしくは結合部位の抗体対を可能とする二重特異的である多価性抗体を導入することが有利である。

それぞれ第一ペプチドリンクマーにより共有結合している一本のV₁と一本のV₂

ドメインとを有する一本の抗体フラグメントは、第二ペプチドリンクマーによって結合されて、完全抗体の結合活性を有している多価一本の抗体を形成できることが見受けられた。結論において、本発明は抗体に対する活性性を有する多価一本の抗体であり、ここでこの多価一本の抗体は2本以上の多価ドメインと2本以上の導結合ドメインとを含んで成り、ここで各ドメインは少なくとももう一つの別々の可変ドメインに連結されている。

別の結論において、本発明は2本以上の一本の抗体フラグメントを含んで成る多価一本の抗体であり、各フラグメントは抗体に対する活性性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンクマーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 組合可変ドメインを含んで成る第一ペリペプチド；
- (b) 組合可変ドメインを含んで成る第二ペリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のペリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンクマー；

を含んである。

別の結論において、本発明は、多価一本の抗体をコードする (即ち別々を含め) ここでこの多価一本の抗体は2本以上の一本の抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗体に対する活性性を有しており、ここでこれらはフラグメントは第一ペプチドリンクマーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

- (a) 組合可変ドメインを含んで成る第一ペリペプチド；
- (b) 組合可変ドメインを含んで成る第二ペリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のペリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンクマー；

を含んである。

この多価一本の抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するか、サイズにおいてもとが大きく、より適切な免疫活性を有する抗体がフラグメントの構造を可能とする。多価一本の抗体は、結合部位が複数個の抗体決定基でありうる多価一本の抗体の特異性も活性とするであろう。

体フラグメントを有する。この抗体フラグメントは連結されて、

V₁-L-V₂-L-V₁-L-V₂ ; V₁-L-V₂-L-V₁-L-V₂ ; V₂-L-V₁-L-V₂-L-V₁ ; 又は

V₂-L-V₁-L-V₂-L-V₁

のV₁とV₂ドメインの順序を可変する二種の一本の抗体を形成してよい。

三価以上の一本の多価抗体は、追加のペプチドリンクマーによって二つの一本の抗体間に連結された又は新たに抗体フラグメントを有する。好適な型様においては、V₁とV₂ドメインの数は等しい。

本発明は、

V₁-L-V₂-L-V₁-L-V₂ 又は V₂-L-V₁-L-V₂-L-V₁

で表示される多価の一本の抗体を提供する。

V₁-L-V₂-L-V₁-L-V₂ (Fab1) 及び V₂-L-V₁-L-V₂-L-V₁ (Fab2) の形態を有する共有結合型一本の抗体を図1に示す。非共有結合型Fab一本の抗体 (Fab) も図1に示している。

本発明において利用するための一本の抗体フラグメントは任意の抗体の形態及び又は特異可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その重鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に結合可能である。連結されて多価の一本の抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本の多価抗体についてのFab配列を含むベクターを形成するため、これらの類似をスクリプトする遺伝子の起始が必要とされる。通常なFab配列は公式的に起始から入力するか、又は当業界で公知の標準の手順によって導出できる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された Kabat らの Sequences of Proteins of Immunological Interest 第4版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を表示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングするDNAの供給として、逆転写酶連鎖酵素結合によりRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、遺伝子の起始は広範囲にわたるハイブリッドomaから獲得できる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Cu

図面の商品と説明

図1は、V₁-L-V₂-L-V₁-L-V₂ (Fab1) と V₂-L-V₁-L-V₂-L-V₁ (Fab2) の形態を有する共有結合型一本の抗体及び非共有結合型Fab一本の抗体 (Fab) を示す。

図2は CC49V₁ (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V₁ (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V₂ (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V₂ (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は pGEMBLK (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本の抗体L1H1のスクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は pGEMBLK (SEQ ID NO: 8) におけるCC49一本の抗体L1H1のスクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pGEMBLKの構造を示す。

図9はプラスミド pGEMBLKの構造を示す。

図10はプラスミド pGEMBLKの構造を示す。

図11は CC49Fab1 及び CC49Fab2 を用いた、競合因子としてジオキニル化 CC49Fab2 を用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で舉げた全ての文献の表示全文を引用することで本明細書に組入れる。

重鎖、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を除すとき、それらは IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 又は当業分野の実験に従って示している。

本明細書で用いる「一本の抗体フラグメント」 (Fab) 又は「抗体フラグメント」なる語は、V₁ と V₂ により表される、ペプチドリンクマー (L) により V₁ ドメインに連結された V₁ ドメインを含むオリベプチドを意味する。V₁ と V₂ ドメインとの順序は並べてよく、V₁-L-V₂ として示されるボリペプチドが構成である。「ドメイン」は、後の構造、例えば最初結合又は抗体構造を表すオクタペプチドのセグメントである。

「多価一本の抗体」はペプチドリンクマーにより共有結合した2本以上の一本の抗体

ture Collection, 20300 Park Lane Drive, Rockville MD, USA (1990) を参照のこと、その中に挙げられているは似たような抗原と反応性のモノクローナル抗体を分類するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの抗原系と日々の他の医療の需要が、何れドメインをコードするmRNAの配列として、又はモノクローナル抗体全体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を医療するように利用できうる。

抗体の可逆吸着法、過量な対物抗原、又はその家筋抗原とともにして若も好合物にはマウスを免疫することにより得られる。その免疫層は免疫の抗体である、又はマウスはハブチジンであると、キーカーリルリバットヘモジン(ELISA)の抗体の活性に付けるこのハブチジンの抗原性抗体はであろう。免疫化は衛生細菌動物への適応は2~3週間間隔の免疫接種の1回又は4回の繰り返し注射によって好んで体内に生れうる。適応、最終の免疫の3日後、既にあり出し、そしてこれが当量常に公知の免疫予感により簡単に医療できるようにハイブリドーマを入手するための即時融合に利用する装置装置等と併用する。

頭脳の反応が狂揚でき、そしてそのアミノ酸配列だけを切り替なら、その部分を変換写することが可能である。

本発明において有用なV₁ 及びV₂ ドメイン構造ましくは、1920年2月3日に
公表された PCT/JP86/00595 及び1983年1月26日に公開された PCT/JP83/0
353/00552 に開示されている、左端端子を複数タップ端子に対する 連続
状態の一つから選択する。より詳しいのは、PCT公報 No. 90/04416 及び
No. 90/02699において(14)と表示される、ソニクロナタ体に出来るるV₁
及びV₂ ドメインである。(14)のV₁ をコードするアクリオド配列(SEQ ID
No: 1)は図2に示すと実質的に同じである。(14)のV₂ のアクリオド配列(SEQ
ID No: 2)は図3に示すものと実質的に同じである。(14)のV₁ をコードする
アクリオド配列(SEQ ID No: 3)は図4に示すものと実質的に同じである。(14)
のV₂ をコードするアミノ酸配列(SEQ ID No: 4)は図5に示すものと実質的に
同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペニチドリンカーラーを得ることが必要である。 V_H と V_L ドメインを連結するための最

当なりシカーは、V_u と V_l ドメインが、一本脚毛ベブチドであって完全立体のものとの構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその伝体フラグメントが出来している完全立体の結合基質を有しているボリペプチドへとがれたたされることを可能にするものである。IgF₁を保護するための通常なりシカーは、各イムノグロブリンフラクションの。及び V_u ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが有している完全立体の結合特異性を保護するような三次構造を有するように、2 回以上の IgF₁を固定することの特異性のものである。高純度の竹田セラチンシカーは、その脚毛結合部を引抜くことで本明細書に記載する米国特許第 4,546,775 号に開示の方法により獲得できうる。これ第 4,946,773 号に記載の方法により作られたボリペプチド配列より、ボリペプチドをコードする遺伝子配列が得てできる。

すましくは、V_u と V_l ドメインを連結して IgF₁ を形成せしめるボブチドリンクーと、2 以上の IgF₁ を連結して多量の一本鎖立体を形成せしめるベブチドリンクーとは、更に詳しくは、アミノ酸配列を示す。

そのリンカーベプチドは抗体フラグメントに対して、その他の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合活性を妨害しないように工夫されていることも必要である。

好適なリンカーは、PorterらのBiochim. 30: 6117 - 1025 (1961) に掲示されている205Eと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にある Lys^1 部位と、他端にある $\text{Biotin}^{\text{Biotin}}$ 部位により指定されるコドンを理由に変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu Ser Ala-Asp-Asp-Ala-Lys Asp Ala Ala Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Lys .

このリンクーは一般に10~50のアミノ酸残基である。最もしくは、このリンクーは10~30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンクーは12~30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンクーは15~25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現様体にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一方に、かかるベクターは宿主細胞と適合する性質に由来するレブリコムとシントニール配列とを含む。このベクターは通常レブリコム導入、及び形成した株の中での表現型選別を提供するとのできを判定の遺伝子を保有している。

例えは、大腸菌 (*E. coli*) は pBR222 を用いて容易に形質転換される (*Bolivar et al.*, 1977) 又は *Saccharomyces cerevisiae* (*Manuel A. Claudio, Cold Spring Harbor Press, New York* 第 2 版 (1959))。

異種細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. レビジス (*S. cerevisiae*) 又は一株のパン酵母が良性生牛糞の中でも一株的に利用されているから、多くのその他の株、例えばビシテ・バストリス (*Escherichia coli*) が有用である。多種微生物、例句はATCCより入手できる S72/16 又はチャイニーズムスグー細胞系に由来する細胞の培養物も有用として利用できよう。細胞動物細胞にとって適当な典型的なベクター・プラスミドは pSV2neo 及び pSV2gpt (ATCC) ; pSV2 及び pSV2K-16 (Pharmacia)。pDPV-1 ; pML2d (International Biotechnology, U.C.) である。

本発明のポリペプチドについて心筋梗塞を免強するための臍核及び直核リポソーム免強ベクターの利用も考慮される。

この異種ペクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部位において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が導入の機会にとって固有であることが好ましい。ペクター-及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、改めて任意の種々な方法、例えばSambrookら、芦井らに記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本頭の多筋状体の製造にとって好適なペプチドの組合子異常体は、構成的に正性な配列プロモーター、新生一本頭ポリペプチドの合成分成部位以外の部分を構成するシグナルペプチドをニンコードする量を含むものである。すなましくは、その免被活性度、不活性化度としてそのポリペプチドが医薬作用する所を避けるために結合、折りたたみ及び構造異性とつり合う。レブリコン及びビニコロール配列に加えて、本頭ポリペプチドの適度な台形によって活性の発現が必要とされる。これらの要素にはスルギシグナル、並びに軽量プロモーター、エクサンサー、及び核粒シグナルが含まれる。更に、適切の遺伝子及びこれを

牛皮物が変形及び折りたたみを防ぐために必要なときは（シャバロン）。
用紙されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たさないように簡単に
変更される。かかる変更は入力できる書物及び本明細書における教示により、
当考鏡によって商品に係るされる。

更に、このクローニングベクターは速眠マーク、例えば麻薬耐性マークへ、又は宿主細胞による選別できる青色の発色を引き起こすその他のマークを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、膜貫通技術を用いて構造されたベクターにより細胞内に形質転換される形態である。実質的に性質をもつての選別マークへは形質転換の選別がある程度助長することを意図する。更に、速眠マークへ、例へば麻薬耐性マークの存在は、実験微生物が基質を途中で蓄積することを防ぐうえで利用される。この性質において、かかる特殊な形質は細胞の活性物質をどのために蓄積された疫病原を必要とする条件のもとで細胞を増殖することに利用されるであろう。

えん、もしそれらが真珠母層の中に分泌されるなら、この一セロ層の多筋胚体は胚外胚盤より遮断されうる。そのボラベチドは嵌合胚層のペリオラマ空間へと輸送されるなら、初期はその周囲に浸透圧ショックをもたらし、次いで胚外胚盤、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラシロマトグラフィー及びゲル通過を実行することにより遮断されうる。不活性であり、且つ屈折率 (refractive bodies)、透射封入体として存在しているボラベチドは、細胞の変形、封入体を想定するための重心と次みの移り送り、例へばダニアシンナー附による可塑化、及び再度の折りたたみ、それに嵌合胚活性は子の前駆によって解消できる。

特表平7-503622

lectical Devices Corporation, Nashua, NH)を用いたDE-450 mmでの水溶性スキャニングにより測定した。scFv2の場合、発生の弱い低下を伴うドナチニル化(62%)の場合の低下をもたらした。

SBS-PAGE及びクエスチョンボッティング

SBS-PAGE分析のためのサンプル (20 µl) を、非導電性サンプル更張ペーパーTM (Separax 1 (Integrated Separation Systems, Milpitas, CA)) の中に5分間浸漬することにより調製し、そして0-20%斜面のボリブクサリアミド (Biorad, Hercules, CA) にその表面を仕様書 (155) に従って載せた。

電気泳動は、Biorad 2-ゲル装置 (155) を用い、ゲル当り55mAで、一一定の電流で約75分間行った。ゲルはクマグリブリンドルブルーR (25) (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準は子孫承認られており (Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)。そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリーゼ、グルタメートヒドロゲナーゼ、オバルブシン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、酸酵アントヒドロゲナーゼ、ヨーラクトグロブリニアヒドロキロームC。対応の分子量はそれぞれ66,000, 55,000, 43,000, 38,000, 28,000, 18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリケートのゲルを用意した。電気泳動後、ゲルの一方を過酸化バッファー (10.3Mのトリス-HCl, pH 6.4) の中で15-20分平衡にした。Immobilon P-PVDF (ポリビニリデンクロリド) 膜 (Millipore, 3 Miller, MA) をメタノールで2分洗浄し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に過酸化バッファー (1) の中に3分平衡にした。Milliblot-SDE 培養液 (100 µl) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に写せるために用いた。一滴の培養液 (1) を過酸化バッファーの中央に落とした。Whitman 3WV 薄膜のシートを接着バッファー (1) の中に落し、そしてその毛細効果の上に滑らかに展いた。接着バッファー (25mMのトリス、pH 6.4) の中に浸した別の乾燥紙を一晩の間に載せた。次に過酸化PVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に重ね、そしてガラスに接着バッファー (10倍のグリシン中のトリス-HCl, pH 6.4) の中に浸した過酸化バッファーを加えることによってランドイッテを作った。乾燥紙は250mMの定電荷液 (初期電圧は8-20ゲルト) で筋歯した。用いて30分で透せられた。

ブロットした後、その膜を水の中で簡便にすすぎ、そして20mlのブロッキング液 (トリス緩衝食塩水 (TBS) 中の1%の牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, St. Louis, MO)) を有する皿の中に入れた。TBS はFisher Chemical (Rockland, ME) により、チーズ糸を水として購入し、50mlの水を加えたとき、その濃度は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウムである。pH 7.6を調整する。これらの液体を少しだけ残す、周囲温度でブロッキングし、そして16h (1) つ目の0.5%のツイーン20洗浄液 (TTBS) を用いて5分間は回洗った。TTBSを調整するには、0.5mlのツイーン-20 (Sigma) を75mlのリッター当たり混合した。使用したプローブ抗体は200µlのオニール化 (16) 14本をとした (ICG-2-25kDa) の抗体 (バッファー)。抗体バッファーは100mlのTTBS当り1gの BSAを加えることにより作った。周囲温度で30-60分ブローピした後、その膜を上記の過酸化液で3日洗った。

次に、その膜を周囲温度において30-60分、抗体バッファーの中で1:500希釈のアルカリホスファターゼを含むされたストレートアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20mlとインキュベートした。既存工具を上記の通り、この操作に従った。発色反応の前に、膜を脱脂アルカリバッファー (25mM) の中で2分洗った。このバッファーは0.1Mの塩酸水素ナトリウム、1 mMのZnCl₂、H₂O₂ 8.3とした。アルカリホスファターゼにとって最適を作るため、エトロブルーデーブルソリューション (33) クロリド (EBC, Sigma) を70%のジメチルホルムアミドの中に落とした。5-ブロモ-1-クロロ-3-インドイドナフスフェート (EDC) (25µl, Sigma) を別に100%のジメチルホルムアミドの中に落とした。5-ブロモ-1-クロロ-3-インドイドナフスフェート (EDC) (25 µl, Sigma) を別に100%のジメチルホルムアミドの中に落とした。これらの液体も、Promegaよりウニタン見色剤として市販されている。次色のたら、それぞれ120 µlを上記のアルカリ浴液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれを水で洗い流した。

ジオナリル化 PAGE

PAGE (14) は、DE-45に對して特異的な、ATCC No. CEM1025として販売されている本ズミの抗-イデノオタキア抗体 (162a, Kアソクイク) である。PAGEはSigma Rgente Protein Aアフィニティカラム (Yonkers, NY) を用いて精製した。

他のプロトコールに従ったが、ただし荷重バッファーとして0.1Mのクニン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。固分を1.0Mのトリス-HCl, pH 9.0を用いてpH 7.0に中和した。ビオチニ化小化反応は下記の通りに設定した。PAGE (14) (1 µg, 水の中で100 µl) を100 µlの0.1MのZnCl₂, pH 9.0と合せた。ビオチニ化アミノアカロイド (Biotin-X-NS) (CaliBios, La Jolla, CA) (2.5µl) と0.5mlのジメチルスルホキシドの中に入れた。Biotin-X-NS 溶液 (20 µl) をPAGE 14浴液に加え、そして22-40時間反応させた。過剰のビオチニ化アミノアカロイド名、Fluoromethyl Reporter 12 NHJO/ACカラム (Pierce, Rockford, IL) を用いてゲル溝通により洗去した。0.8 µl / mlの速度で、ビオチニ化 PAGE 14は16.8mlのピークで出現した。このピークを構成する両分をブレルし、そして4°Cで保存し、そして-20°C及び-80°Cにより凍結されるCC48イディオタイプを検出するのに用いた。

等電点 (IEF)

等電点 (pI) は、IBAS23 (Madison, WI) を介して入手できる PROTEIN-PAGE (17) という名のコンピュータープログラムを用いて測定した。入力してある配列によるアミノ酸配列に基づき、時に加えて側鎖が得られた。pIは既に電荷に寄与するため、Glyについての計算は特に調整し、なぜならそれらは全てグリューフィド結合に囲まれるからである。

実験的には、Imagelアグロース IEFプレート、pH 3-10 (ICG products, Rockland, ME) を用いて決定した。Biorad Bio-plexesis 水平電気泳動セルを、IEFを行なうのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ゲルト (密度)、20mAの電流及び13Wの定電荷力とした。等電点泳動は90minで完了した。IEF装置はBioradより購入した。そのキャットはフィヨンシアニン、ヨーラクトグリブリソニンB、牛血清アントドローゲン、ヒト臍膜アントドローゲン、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3-レニンチルレチキン及びヒドロキロームCを含み、それとのpI値は1.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00及び8.20及び9.50である。ゲルを、IEFにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

ICG抗体特の定量

IEF scFv2の様子及び背景についても含む複数のICG抗体について、点検している。1.0mMの過酸化水素を含むキュベット (Bellco社) およびPerkin-Elmer 0747HLS 分光光度計360nm光を用いて、タンパク質吸収液中の280nm吸光度を測定して定量した。モル吸光係数 (E₁) は、各抗体について、ト式を用いて算出した。

$$E_1 = (Trp_{\text{吸}}) \times 1.500 + (Tyr_{\text{吸}}) \times 1.340 - ((Cys) 2.0) \times 150 - (Phe_{\text{吸}}) \times 16$$

これらの値は、F. B. Wallenius, Advances in Protein Chemistry, 17版, 375-378頁に記載されている情報に基づいている。

酸性溶液液クロマトグラフィー

ICG scFv2を精製するために行った高性能液相クロマトグラフィーにはすべて、全體にチタンねじはチラボンプを用いた IEF HPLC システムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型检测器、270nmの吸光度に設定されたUV CON (4.0, 2238) 型は出装置および2011型 Separac fraction collectorTM 構成されている。

サブニュートの PAGEによる製造

ゲリマーゼ過酸化度 (POD) はすべて、150ピングラム (pt) のプラスミド標的 (pGEM1EM) ; 100ピコモルのプライマー：(1.1)のPerkin-Elmer-Cetus社 (米国)、コネティカット州、ノーウォータン所在の PEG11TM のAmpli-Tagターミネーター：IE-16として10mM dNTPおよび10µlの10×缓冲液 (両者ともに PEGキットに提供されている)；ならびに合計容積を100µlににするのに充分な水で構成された反応液を用いて行った。PCR反応はマーカーが記載しているとほとんど同様にして行った。これらの反応は、PCR 6600型サーモサイクラー (thermocycler) を用いて20サイクル行ったが、その1サイクルは、94°Cで20-45秒間の DNAの煮沸；52-60°Cで0.5-1.5分間のアニーリングおよび72°Cで0.5-2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社 (米国) カリソミルニア社、オスター・シティ所在の333型もしくは581型 PCR合成装置で合成して上記のようにして複製した。

リゲーション

100ngのベクター 部分および対照する；(1) 化学骨格由来のインサート DNA を用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーリー市)のT4 DNAリガーゼキットを用い、Eco-R1の先にしたがって行った。リゲーション反応物(全容液20μl)は最初10°Cでインキュベートし、次いで一夜まで待機した。

形質転換

形質転換は、300μlのStratagene社の大細胞(E.coli) AG1コンビケント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーリー市)のStratagene社を用い、メーカーの指示に従って行った。上記リゲーションが成功由来の細胞(1～5ml)を用いた。形質転換ステップの後、細胞は、液体を受けながらラムアプロス(LB) 中で37°Cで1時間増殖させ、次いで、pSC100M p49LRRMもしくはp49LRRも用いる20μg/mlのクロラムフェニコール含有(CAN200)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含むするクローンもしくはpSL301由来のその後の構成物に用いる100μg/mlアンブリシン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB+AMP100)上にプレートした。

大腸菌クローンのスクリーニング

細胞プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のBasicミニプレッピングキットを用いて、太太王(selection pressure)を担当するため適切な選択を含むするpBR用形質転換から選択した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

プラスミドを検査

pSL301MおよびpSL301と命名された2種のプラスミドを、多面の一本鉛錠体を形成するために構築した。pSL301を含むする各細胞は、V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄で示すことができるオリベクタードを含むした。ここでV₁とV₂はCCMV構成の粘度と質量の測定部位であり、およびリンクー(L)は、FRT SEQ ID NO: 5の配列を有する25個のアミノ酸のリンクーである。

Lys-Ser-Ala-Asp-Ala-Lys-Lys-His-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-Ala-Lys

pSL301Mを含むする形質転換は、V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄で示すことができる

オリベクタードを生成した。ここでV₁とV₂はCCMV構成の粘度と質量の測定部位であり、およびV₃は上記アミノ酸配列を有するペプチドリンクーである。

pG43V(=Shuttle-L-V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄)のスクレオチド配列 SEQ ID NO: 7)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 8)を図6に示す。(G43V: L-V₁-L-V₂-L-V₃-L-V₄(pG43V))のスクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

pSL301Mの構造

pSL301Mの構造を図8に示す。パシラス・リヘニオルミス(Bacillus licheniformis)のベニシリオバーゼP(ampB)クリメーターの配列を、Xba IおよびBam H Iで45分間消化することによって、pSC100Mが含まれたプラスミドから抜出し、電気泳動を行った後、5%ボリアクリルアミドゲルから切取り、電気泳動させ、エタノールで洗浄させ、次に、同様に配列されたベクター(pSL301)(米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連絡した。pSC100Mの既知子細胞は、1920年6月21日付け出特の米特許許可第5795655号に記載されている。なおこの出願の同表示項目は本願に使用するものである。段に、pSC100Mは、pacPプロモーターのスクレオチド配列：菌有 RecI制限部位：CCTGAT、類似：BamH制限部位：25個のアミノ酸のリンクー；菌有 Xba I制限部位：CCGGAT、類似：Xba I制限部位；pacPクリメーター；およびpacP I制限部位を有している(図8参照)。このpacPプロモーターとpacクリメーターは、Beckman、J. Biol. Chem. 256巻、12211～12215頁、1981年に記載されている。

上記のリゲーション反応の一環(3μL)を、LB+AMP100寒天プレート上にブリントし次いで、液培培養させたコンビケント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。pacPクリメーター、インナートを含むするオクシナルクローンを、Pharmacia社(米国、マサチューセッツ州、ガイサースバーグ所在)のTi Quicky ringTM DNA型別キットと、Bulgeitから、Nucleic Acid Research 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ板によるローニー定義法をともに用いてスクリーニングした。プローブは、pacP-Xba I-pacB1クリメーター(フグメント自身)であるが、Quickprimeキットによって供給された指示によって高純度化

した。陽性プローブであり、かつXba IおよびXba Iによる消化由来の207bpの塩基対插入断片(図6に示す158～2185の塩基対(bp))を含むするクローンをpSL301と命名し、次いでpG43Vに対するスクレオチド配列を含むするpSL301-MTを発表した。Xba I-PacI型別クリメーターをpSL301に用置し、既知は、そのXba IとXba Iの部位の間のオクシナルクローン中に存在するEco47II制限部位を除くためであった。このことは、Eco47II部位が、構造体中に各細胞V₃部位を配置するのにユニケである必要があるV₁とV₂の領域を統一して構築するため設計された。各V₃領域がEco47II-Xba I部位に付加されると、Eco47IIは各場合に破壊され、ユニケ導入断片に入ってくる次のEco47II部位を形成した。

V₃領域は、Eco47IIの部位としてpG43V JMVを用い、オリゴの5' SCP(=3'オリゴSCP5)によってFRTで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5'-TAA CTC CAC GTT CAG TTD CAC GAC-3'

SCP5: 5'-TAA GCT AGC AGC AGC CCT TAA CGA GAC GCT CAC TGA TGA GCT-3'

下線をついた部分はエンドオクシナーゼ制限部位を示す。

培養された V₃ DNAを、4万の PCR、本気断片、エタノールによる沈殿物および20μL TAEへの溶解によって作製した。その上部配列をXba IとXba Iの制限部位で消化し、同じ既知断片で消化され受け、宿主されたpSL301ベクターに付するリンクーとして用いた。各V₃領域のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4μL)を用いてコンピケント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。(G43V、インサートを含むしていることを示す標的のクローンを No.1)およびXba I消化スクリーンから抽出した。

United States Biochemical (US)社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマー-pSL301SEQ(=pSL301ベクター中のXba I部位から5'端)上端においてアミールした5'端の配列決定プライマーとQASWHPを用いて、Xba Iの配列決定を行って、(G43V)の配列を確認し、pSL301中に正しいCC43V配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドは

pSL301-Xba I-PacIおよびpSL301-Xba I-MTの両者を構成するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴを図9に示す。

pSL301SEQ(SEQ ID NO: 12)およびCC43V(SEQ ID NO: 13)のオリゴスクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQ: 5'-TCA TCG GAT TAC CGA AGG TTA 3'

CC43V: 3'-GAT GAT TTT AAA TAC ATT GAG 5'

実験例 1 pSL301の構造

pSL301(5μg)を出発毛質として用い、これを RecI および Xba I で消化し、大さきのベクターフラグメントを精製した。CC43V 携入シグメントは、5' オリゴとして SCP5 を用いかつて 3' オリゴとして SCP5 を用い、PCR によって合成した。SCP5 のスクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP5: 5'-TAA TGT GAA CAT GAC CGA AGG AAA GAC CGA CAT

CGG AAA AGA CAT GAC CGC AGA CAT CTT GAG CGT CTC TGG CAG CGC

TCT 3'

またオリゴ SCP5B はリンクーのコーディング領域の一端(SEQ ID NO: 14のbp 6～70)を有している。pG43V(=Xba I部位のCC43V)のアミールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中の577～600までのものである。

下線をついた配列は Xba I 領域に相当する。得られた PCR インターフーを精製し、Xba I と Xba I で消化し次いで pSL301-Xba I-PacIベクターとのリゲーション反応に用いた(図3)。コンピケント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3μL)で形質転換を行うのに用い、LB+AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301MT 生成物を示す正しい大きさの Xba I-Xba I インサートを有する 2 種のクローンの配列をオリゴ SCP1 を用いて決定し、正しい型別(即ちスクレオチド 1124～1543)を有する該クローンをその後の構成に用いるのに適んだ。SCP1 のスクレオチド配列(SEQ ID NO: 15)は下記のとおりである。

SCP1: 5'-TC ACT TTA CGT AGG ATG ATC T-3'

最終のリンクー V₃ サブユニット(No.1544～1661、図7)は、5' オリゴの SCP5 と 3' オリゴの SCP5B を用いてかつ PCR の複数として pG43V JMV を用いて製造

特表平7-503622

て20Mトリス-BCI pH 7.6±0.5% (±0.1) を含む均一プログラムを、1.5ml/aiの流量で使用した。簡略の生成物は、試合 3LIS4版で測定する場合、各々3~4分弱から放出された。この時点の測定値、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマーシーリアントブルー-3250で染色し、他のゲルはウエスタン分析（プローブ抗体としてゴオチニル化 Fab 14使用）で検されたが、scFv2(LIL3またはLIL1) の量の計算分子量のオーバン（約 32.39ダルトン）の位置に出現した。活性蛋白は各場合測定し、SDS-PAGE pH 6.8に対して一夜透析し、次いで *Phenylacetyl* 蛋白のMass 5 蛋白とスカラシオン免疫カラムに注射した。この検定スカラムから開始の二つの百分のうちも、SDS-PAGE などび LISA法で測定する場合、活性蛋白が開始される前の位置に検出された。したがってこれらの部分は實際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで各分とときはさらに精製するためブールした。

Mass 5カラムを活性Mass 5部分について再び使用したが使用した結果は約3.1%±BCI pH 8.6であり、活性は 0.8ml/分に低下させた。生底物にカラムとの結合なしで放出されたが、Mass 5に残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生底物は死滅であり以後の特徴及ぼすために放置した。

差点測定法

特異物の導出点（pI）は DIASTATE社（米国、ケンタッキーシンシナティ、マディソン所蔵）のコンピュータプログラム Protein-Isleterseを使用して予測した。アミノ酸組成、網およびpIに基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社（米国、ノーン州、ロックランド所蔵）のIgM1 IgEブレット（試験用 3~10を使用して測定した。上記 IgEを操作するため、Biorad社（米国、カリフォルニア州、リッキエンジニア所蔵）の電気泳動装置を、上記同一メーカーの指示にしたがって使用した。その結果測定の条件は、20mAで 500V（設定）および一定電力の10ワットであった。各検点測定時間は30分間で完了した。Biorad社のIgE標準品は、フィヨシアニン、ヨトカルボニックアントゴナーチ、カミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマメンケチンおよびシクロム

Gが含まれ、pI値はそれぞれ 5.5、5.13、6.00、6.50、7.00、7.36、7.8、8.0、8.20 および 9.0であった。ゲルは IEDCの指示にしたがって染色し観察した。DIASTATE プログラムによって両方の scFv2の量の計算として 5.1の値が予測された。純品の生成物に対し单一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の C.6の位置に見とめられた。

IgG scFv2 (LIL3およびLIL1) のような構造のIgG抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光度的に測定することによって定量した。モル吸光係数を。以降、光に引用した Wellauer式を用いて測定した。

そのアノ酸組成に基づいて、CC49icG、CC49icFv2LIL3 CC49 scFv2LIL1およびCC49scFv2のE₂₈₀ (280nm)値はそれぞれ 1.49、1.63、1.65 および 1.71であった。

実験例

CC49scFv2の量のLIL3とLIL1の相対活性を、1.0および以降実験にTAC-72に対する平均活性型と比較した。

バーセント競合 (percent competition) を下記によって LISIAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ混合 試料吸光度値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ混合 - 100% 競合}} \times 100$$

「ゼロ混合 (zero competition)」値は、1:50 854ラビオチニル化CC49 (3×10~14モル) と 1:1 比率で混合して測定し、一方 100%競合値はゴオチニル化CC49と混合した CC49icGの 5 μg/ml濃度に基づいた値である。これらのデータは図1に示す。試料の吸光度値は 405nm~450nmで測定した。3回の測定値の平均値を使用した。最初に試料 (25μl) を、TAC-72でコートしたマイクロリヤンプレートに、1.0×10.10 ナルの結合濃度 (μM) で希釈した。ゴオチニル化CC49 (4 μg/ml 1:20,000) は希釈、25μl 使用) で試料を 1/2 濃度に希釈した。過剰抗体 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は 1:60 には等しい (図1参照)。別の試験で、CC49scFv2単体を Fabフラグメントと比較した。両者は一様であるが、これらは TAC-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、糸有結合の二重体の両者の形態は、二つの元分に

幾何的な比例粘度をもっていることを示している。これに、両者のpI値に比べて今 IgGについてもこれらのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49icXの様と同様に、免疫活性測定の実験で、毛細血管透過性の強度および活性度などから活性測定の利点を有することを示している。この利点によって、両者の scFv2分子に比べて、本発明の化合物は多回測定することができ、かつ細胞質に用いる免疫活性において活性度を高めることができることである。

本発明の他の実施形態は、本明細書を参考するかまたは本発明に記載されている範囲を実験することから、当該技術分野の当業者がとて明らかになるであろう。本発明の各実施形態は、本明細書の範囲の遼闊範囲と想定は以下の様の範囲によって示される。

以上

請求の範囲

1. 2以上の一重体抗体フラグメント、を含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンクマーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンクマーが下記のアミノ酸配列

Lys Ser Ala Asp Arg Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys
Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは：

- (a) 細胞可変ドメインを含んで成る第一ペプチド；
- (b) 細胞可変ドメインを含んで成る第二ペプチド；及び
- (c) これ第一と第二のオリーブペプチドを機能的な結合性成分へと連絡せしめる

第二のペプチドリンクマー；

を含んで底を、多様の一本鎖抗体。

2. 前記細胞可変ドメインの配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
Tyr Ser Ily Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Ily Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Ily Ala Ser Ala Arg
Glu Ser Gly Val Phe Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Thr
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Lys

と実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記細胞可変ドメインの配列

Glu Val Gln Ile Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
Asp Ala Ala Ile Ile Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Cys

Asn Gln Arg Phe Lys Glu Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Ieu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp
Gly Cys Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 前記第一と第二のペプチドリンクが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

6. 多価の一一本鎖抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが互にに対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンク

一を介して共有結合されており、そして各フラグメントは：

(a) 蛋白可変ドメインを含んで成る第一オリペプチド；

(b) 蛋白可変ドメインを含んで成る第二オリペプチド；及び

(c) この第一と第二のオリペプチドを親和的な結合部位へと連絡せしめる

第二のペプチドリンク；

を含んで成る、前記配列。

7. 前記第一オリペプチドをコードする配列が下記の配列：

CAC ATT GTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GCG TCA
CTT GGC GAG AAC GTC ACT TTG AGC TCC AAG TCC AGT CAG AGC
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCT TGG TAC
CAC CAG AAC CCA CGG CAG TCT CCT AAA CTC CTC ATT TAC TTG
GCA TCC CCT AGC CAA TCT CGG GTC CCT GAT CCG TTC ACA GGG
AGT GGA TCT CGG ACA CAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTC
AAG ACT GAA GAC CTC GCA CCT TAT TAC TTG CAG CAG TAT TAT
AGC TAT CCC CTC AGG TTC GGT GCT GGG AGG CTC CTC CTC CGG
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二オリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAC GTT CAG TTG CAG CAG PCT GAC CCT GAG TTG CTC AAA CCT
GGC GCT TCA CTG AAG ATT TCC TCC AAG GCT CCT GGC TAC ACC
TTC ACT CAC CAT GCA ATT CAC TTG TTG AAA CAA AAC CTC GAA
CAG GCG CTG CAA TCG ATT GCA TAT TTT PCT CCC GCA AAT CAT
GAT TTT AAA TAC AAC GAC AGG TTC AAC CCT AAC CCC ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCT TAC GNG CAG CTC AAC
AGC CTG ACA TCT GAG GAT PCT GCA GCG TAC TTC PCT ACA AGA
TCC CTC AAC ATG GCG TAC TGG CCT GAA GGA AGC TCA GTC ACC
GTC CCT TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。